

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kasein**

Kasein merupakan fosfoprotein paling dominan yang terdapat pada susu. Di dalam susu sekitar 80% dari proteinnya adalah kasein yang biasanya berupa garam dari kalsium. Kasein tidak dapat dikoagulasi oleh panas namun kasein dapat diendapkan oleh asam dan enzim rennet. Kasein merupakan senyawa amfoter yang dapat bereaksi dengan asam maupun basa. Hal ini disebabkan karena molekulnya mempunyai muatan positif dan negatif. Pada saat titik isoelektrik dicapai, muatan positif dan negatifnya adalah sama. Kasein dapat secara mudah mengendap pada titik isoelektriknya karena kasein mengalami dehidrasi (Winarno, 2007)

Kasein bersifat hidrofobik, kasein memiliki muatan yang cukup tinggi yang banyak mengandung prolin dan beberapa residu sistin. Kasein menunjukkan kecenderungan untuk berasosiasi dengan protein lain dan juga beberapa ligan, sesuai karakter hidrofobik dari misel. Kasein diketahui kaya akan protein prolin (Yuksel, Avci, and Erdem, 2010). Berdasarkan kandungan hidrofobisitas muatan dan prolin, terdapat empat jenis kasein yang berbeda, yaitu  $\alpha_1$ -kasein,  $\alpha_2$ -kasein,  $\beta$ -kasein, dan  $\kappa$ -kasein. Setiap jenis kasein memiliki struktur yang berbeda-beda. Kasein digambarkan sebagai protein yang tidak berstruktur dengan kandungan prolin yang relatif tinggi. Kasein relatif hidrofob, yang membuatnya sangat kurang larut di dalam air (Bohin, et al., 2014)

## **2.2 Katekin Kulit Buah Kakao**

Kulit buah kakao mengandung senyawa aktif flavonoid atau tanin terkondensasi atau terpolimerasi, seperti antosianidin, katekin, dan leukoantosianidin yang banyak terikat dengan glukosa (Mulyatni, Budiani, dan Taniwiryono, 2012). Senyawa polifenol golongan flavonoid kakao memiliki aktivitas antioksidan yang sangat bermanfaat bagi kesehatan tubuh (Kusuma, Suwasono, dan Yuwanti, 2013). Polifenol golongan flavonoid terutama katekin dan epikatekin adalah komponen utama dalam produk kakao yang berperan sebagai antioksidan. Mekanisme aktivitas antioksidatif polifenol kakao belum banyak dipublikasikan, meskipun beberapa peneliti menyatakan bahwa polifenol kakao dapat mencegah terbentuknya radikal bebas, berpengaruh terhadap antimutagenik, dan dapat menghambat tumor. (Supriyanto, Haryadi, Rahardjo, dan Marseno, 2006).

Selama penyangraian polifenol mengalami kerusakan, sehingga rasa pahit dan sepat menurun, dipercepat oleh panas. Sampai sekarang penyangraian kakao masih dilakukan dengan pemanasan cara konvensional, dengan kecepatan perpindahan panas terbatas pada tiga cara standar, yaitu konduksi, konveksi, dan radiasi, menyebabkan pemanasan berlangsung lambat. Dalam keadaan demikian senyawa polifenol banyak berubah karena lama terpapar dengan oksigen udara pada suhu relatif tinggi, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas antioksidatifnya (Supriyanto, dkk., 2006).

## **2.3 Interaksi Kasein-Katekin**

Kasein digambarkan sebagai protein yang tidak berstruktur dengan kandungan prolin yang relatif tinggi dan berkemampuan untuk berinteraksi dengan dirinya sendiri

ataupun dengan kasein lain pada misel. Residu prolin dan pengulangan prolin diketahui sebagai penentu interaksi protein-fenolik. Oleh sebab itu, berdasarkan kandungan prolinnya,  $\beta$ -kasein mampu menunjukkan afinitas yang lebih tinggi untuk fenolat daripada  $\alpha$ -kasein (Bohin, et al., 2014). Polifenol mengikat lemah  $\alpha$ -kasein dan  $\beta$ -kasein melalui interaksi hidrofilik dan hidrofobik. Namun  $\beta$ -kasein membentuk kompleks yang lebih kuat dengan polifenol daripada  $\alpha$ -kasein karena sifat  $\beta$ -kasein lebih hidrofobik (Hasni, et al., 2011)

Molekul tertentu seperti protein susu diketahui sebagai pelindung senyawa fenolik, utamanya katekin (Carnovale, Britten, Couillard, and Bazinet, 2015). Polifenol secara umum berinteraksi dengan globular protein dan dapat menyebabkan perubahan struktur dan konformasi protein. Afinitas pengikatan tergantung pada ukuran molekul polifenol, semakin tinggi molekul polifenol semakin besar kecenderungannya untuk membentuk senyawa kompleks dengan protein (Gallo, Vinci, Graziani, Simone, and Ferranti, 2013). Pengikatan ini bisa mempengaruhi kapasitas transfer elektron katekin dengan mengurangi jumlah gugus hidroksil yang tersedia di dalam larutan (Hasni, et al., 2011).

Senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan protein terutama yang kaya akan prolin seperti *salive* dan kasein. Prolin memiliki afinitas yang kuat untuk hidroksil (-OH) pada kelompok katekin. Penambahan polifenol dapat meningkatkan stabilitas panas dari susu dan meningkatkan waktu koagulasi (Yuksel, et al., 2010). Interaksi antara protein susu dengan katekin pada polifenol yaitu interaksi hidrofobik yang bersifat non-kovalen dan distabilkan oleh ikatan hidrogen. Pengikatan non kovalen termasuk hidrofobik, van der waals, pengikatan jembatan hidrogen, dan

interaksi ionik ini lebih lemah dari ikatan kovalen dan selalu reversibel (Jakobek, 2015).

Interaksi antara flavonoid dengan protein susu bisa menjadi aditif makanan yang bisa diterima karena aktivitas antioksidan dan antikarsinogenik, jadi keduanya dapat berkontribusi terhadap fungsional produk. Interaksi flavonoid dengan protein susu menampilkan subyek yang penting karena interaksi tersebut bisa menjadi bahan tambahan makanan yang potensial (Yuksel, et al., 2010)

## **2.4 Mineral**

### **2.4.1 NaCl**

NaCl merupakan nama kimia dari garam dapur. NaCl memiliki dua unsur senyawa kimia yaitu logam Natrium (Na) dan gas klor (Cl). Kedua senyawa ini bila direaksikan akan memiliki manfaat. Hal ini karena adanya pengaruh dari anion-anion yang diikat oleh Na dalam NaCl sehingga sifat dari Na yang berbahaya dapat hilang. Dalam padatan ionik seperti kristal yang tersusun dari ion-ion akan terjadi tarik-menarik antara anion dan kation yaitu gaya elektrostatik Coloumb serta tolak-menolak ion sejenis. Senyawa NaCl juga bersifat larut dalam air (Herlin, 2012).

NaCl dapat memberikan suatu kontrol terhadap keseimbangan antara polar dan nonpolar protein ke arah pembagian residu nonpolar. Konfigurasi protein akibat penambahan NaCl memberikan pengaruh terhadap interaksi elektrostatik antara polar dan nonpolar grup, dan juga interaksi hidrofobik melalui modifikasi struktur air dan protein. Peningkatan konsentrasi NaCl mengakibatkan kelarutan protein menjadi berkurang dan mengakibatkan terbentuknya agregat

molekul protein yang merupakan hasil kompetisi antara molekul air dan protein (Siswoyo, 2006).

#### 2.4.2 $\text{CaCl}_2$

Kalsium Klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) adalah senyawa ionik yang terdiri dari unsur kalsium dan klorin.  $\text{CaCl}_2$  berbentuk padat pada suhu kamar dan sangat larut pada air. Karena sifat higroskopisnya,  $\text{CaCl}_2$  harus disimpan pada kondisi rapat dan kedap udara.  $\text{CaCl}_2$  dapat berfungsi sebagai sumber ion kalsium dalam larutan, tidak seperti kebanyakan senyawa kalsium lainnya, kalsium klorida larut. Sifat ini berguna untuk menggantikan ion dari larutan (Sridianti, 2016).

Ion  $\text{Ca}^{++}$  pada kalsium berpengaruh besar terhadap proses koagulasi kasein susu oleh rennet, khususnya pada tahap agregasi. Terbentuknya gumpalan kasein tergantung pada ketersediaan kalsium terlarut dan juga level koloid kalsium. Kalsium berperan dalam menetralkan muatan negatif misel kasein dan juga menjadi jembatan penghubung antar gugus fosfat yang bermuatan negatif (Sumarmono, 2012). Protein susu dapat diendapkan dengan penambahan  $\text{CaCl}_2$  yang jenuh. Namun konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  yang tidak terlalu jenuh tidak menimbulkan terjadinya pengendapan. Garam dapat memecah interaksi hidrofobik dan meningkatkan daya kelarutan gugus hidrofob dalam air (Winarno, 2007)

#### 2.4.3 $\text{KCl}$

Kalium klorida ( $\text{KCl}$ ) merupakan garam logam halida terdiri dari kalium dan klor. Ion  $\text{KCl}$  bermuatan positif, dimana dalam kaitannya dengan interaksi protein susu dapat menggantikan ion  $\text{H}^+$  dari kelompok asam protein yang dapat menurunkan pH. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa

kumpulan droplet dalam emulsi protein stabil pada penambahan mineral seperti Ca, Na, dan K. Flokulasi terjadi karena ion logam mengurangi tolakan elektrostatis diantara droplet sehingga memungkinkan droplet berdekatan. Di sisi lain, koalesensi dicegah karena selaput protein disekitar droplet menghasilkan tolakan sterik jangka pendek yang sangat kuat. Konsentrasi KCl yang lebih besar dari 200 mM mempengaruhi ketidakstabilan emulsi menyebabkan flokulasi dan *creaming* (Keowmaneechai and McClements, 2002).

## **2.5 Kualitas Fisik**

### **2.5.1 Emulsi Mikroskopis**

Emulsi adalah proses terdispersi atau tersuspensi suatu cairan dalam cairan lain yang molekulnya tidak saling berbaaur tetapi saling antagonistik. Pada suatu emulsi biasanya terdapat tiga bagian utama, yaitu bagian yang terdispersi berupa butiran yang terdiri dari lemak, bagian media pendispersi yang terdiri dari air, dan bagian emulsifier yang berfungsi menjaga agar butir-butir minyak tetap tersuspensi dalam air. Molekul-molekul dari senyawa tersebut memiliki afinitas terhadap kedua cairan itu (Winarno, 2007). Zheng, Jia, and Jiang (2014) menyatakan bahwa kegiatan emulsi dari emulsifier protein tergantung kepada kemampuan untuk membentuk film adsorpsi seperti butiran minyak. Aktivitas peningkatan emulsi dapat dikaitkan dengan perubahan dalam sifat konformasi dan struktur permukaan protein. Perubahan struktur protein dengan konformasi akan mempengaruhi permukaan hidrofobisitas dan menyebabkan adsorpsi yang baik pada sistem emulsi minyak dan air.

Agregasi droplet dalam emulsi protein stabil pada penambahan mineral seperti Ca, Na, dan K. (Keowmaneechai,

et al., 2005). Menurut Raikos (2010) bahwa protein susu mampu mengurangi tegangan permukaan dengan menyerap tetesan minyak yang baru dibentuk. Hal tersebut menunjukkan emulsi terjadi bila ditambahkan suatu zat yang dapat menurunkan tegangan antarmuka diantara dua cairan yang tidak tercampurkan, sehingga mengurangi tolak-menolak antara kedua cairan tersebut dan mengurangi tarik-menarik antar molekul dari masing-masing cairan, atau menyebabkan cairan menjadi tetesan yang lebih kecil.

### 2.5.2 Aktivitas Emulsi

Indeks aktivitas emulsi atau *Emulsion Activity Index* (EAI) mencerminkan produk isolat dalam berinteraksi dengan air dan minyak selama pembentukan emulsi. Peningkatan nilai EAI produk interaksi disebabkan gugus hidrofobik dan hidrofil yang semula terlindungi lebih mudah bergerak ke permukaan. Deformasi molekul tersebut menyebabkan respon permukaan (*respon surface*) menjadi lebih besar untuk berinteraksi dengan pelarut non polar dan polar seperti minyak dan air melalui interaksi hidrofobik dan hidrogen yang dibuktikan dengan angka *Oil Holding Capacity* (OHC) dan kelarutan produk interaksi. Besar kecilnya nilai EAI berhubungan dengan sifat hidrofobitas protein (Sukanto, Aulanni'am, dan Sudiyono, 2009).

Daya emulsi dapat dinilai berdasarkan EAI yang mencerminkan kemampuan dari produk isolat dalam berinteraksi dengan air dan minyak selama pembentukan emulsi (Legowo and Hayakawa, 2005). Aktivitas pengemulsian berhubungan dengan kemampuan protein untuk menutupi antar permukaan minyak-air. Aktivitas pengemulsian protein tergantung dari luas antar permukaan globula minyak yang

distabilisasi protein. Kemampuan emulsifikasi protein yang tinggi dapat ditunjukkan oleh nilai EAI yang tinggi. EAI menunjukkan kemampuan protein untuk menstabilisasi antar permukaan minyak-air. EAI yang berhubungan dengan luas permukaan ini apabila semakin tinggi EAI maka ukuran globula minyak dalam emulsi semakin kecil. Nilai EAI akan mengalami penurunan dikarenakan peningkatan ukuran globula minyak dalam emulsi (Estiasih dan Ahmadi, 2008).

### 2.5.3 Stabilitas Emulsi

Stabilitas emulsi merupakan suatu sifat emulsi yang dapat mempertahankan sifat fisik yang teratur dari fase terdispersi dalam jangka waktu yang panjang sehingga dapat menjaga kualitas, kekuatan, dan kemurnian produk. Kemampuan tersebut dapat diukur menggunakan indeks stabilitas emulsi. Banyak metode untuk pengujian emulsi salah satunya menggunakan alat spektrofotometer (El-Kheir, Yagoub, and Baker, 2008). Kestabilan emulsi memiliki peran penting dalam menentukan sifat emulsi pangan yang salah satunya dipengaruhi oleh protein. Protein berperan meningkatkan busa, pengemulsi, pembentuk gel, dan sebagai pengikat air. Protein dalam pangan diserap pada permukaan cairan antara fase cairan dan gas, sehingga menstabilkan struktur pangan (Ibanoglu and Karatas, 2001).

Sistem dispersi dikatakan stabil jika partikel padatan tetap terdispersi merata ke seluruh bagian medium pendispersi. Ketidakstabilan suspensi dapat terjadi apabila partikel mengelompok bersama-sama membentuk agregat, kemudian karena gaya agregatnya akan mengendap. Agregat dapat terjadi karena flokulasi. Flokulasi merupakan penggabungan bersifat irreversibel yang disebabkan rusaknya lapisan pelindung



(Mardyanto dan Sudarwati, 2015). Kerusakan emulsi dapat dilihat dengan bahan penyusunnya yang terpisah, terdapat gumpalan-gumpalan kasar yang timbul berbentuk longgar dan tidak teratur serta adanya perubahan butir-butir emulsi yang kecil menjadi butir-butir yang lebih besar. Pemecahan emulsi dapat diakibatkan karena adanya pemanasan, pengadukan mekanis yang kuat, dan sentrifusi kecepatan tinggi (Muthiah, 2013).

#### 2.5.4 Daya Buih

Daya buih (*foaming*) susu termasuk dalam sistem koloidal yang terbentuk dari tingkat kestabilan komponen penyusun susu (Borcherding, Hoffman, Lorenzen, and Schrader, 2008). Pembentukan busa dipengaruhi oleh adsorpsi dan kemampuan untuk mengurangi tegangan permukaan dengan cepat (Rodriguez, Staszewski, and Pilosof, 2015). Nagarajan, Benjakul, Prodpran, Songtipya, and Kishimura (2012) menambahkan bahwa daya buih susu dapat terbentuk oleh kemampuan protein saling berkaitan dalam membentuk film pada tegangan antarmuka air udara. Penyerapan protein ke tegangan antarmuka air udara yang lebih cepat menunjukkan daya buih yang lebih baik dibandingkan penyerapan yang lebih lambat.

Dijelaskan oleh Zheng, et al., (2014) bahwa metode *crosslink* dapat meningkatkan daya buih. Pengujian daya buih merupakan salah satu persyaratan penting dalam pembuatan pangan. Daya buih tersebut dapat menunjukkan kemampuan protein berinteraksi dalam proses emulsifikasi dengan agen *crosslink*. Modifikasi protein dapat meningkatkan sifat fungsional protein seperti berbuih dan tahan terdenaturasi (Rodriguez, et al., 2015). Menurut Kuropatwa, Tolkach, and

Kulozik (2009) menyatakan bahwa buih dikenal sebagai koloid termodinamika yang stabil, terdiri atas fase gas konsisten yang terdispersi dalam cairan serta beberapa faktor penting yang dapat mempengaruhi pembentukan buih yaitu konsentrasi protein, struktur protein, berat molekul, pra-pengolahan dengan panas atau kimia, dan pengocokan atau secara fisik, akan menghasilkan molekul protein yang memiliki hidrofobik yang lebih tinggi sehingga menunjukkan daya buih yang lebih baik dan terjadi peningkatan kapasitas buih.